

PATENT APPLICATION  
Mo6761  
LeA 35,018

1c997 U.S. PTO  
09/988863  
11/21/01

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

APPLICATION OF )  
RUTH MEISSNER ET AL )  
SERIAL NUMBER: TO BE ASSIGNED )  
FILED: HEREWITH )  
TITLE: PLANT PHOSPHOMEVALONATE )  
KINASES )

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 USC 119**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231  
Sir:

Applicants hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, 119, as stated on their previously submitted Declaration and Power of Attorney document. Applicants further submit the enclosed certified copies of German application 100 57 755.5, claiming foreign priority on the above-identified U.S. application.

Respectfully submitted,

By Raymond J. Harmuth  
Raymond J. Harmuth  
Attorney for Applicants  
Reg. No. 33,896

Bayer Corporation  
100 Bayer Road  
Pittsburgh, Pennsylvania 15205-9741  
(412) 777-8366  
FACSIMILE PHONE NUMBER:  
(412) 777-8363

/jme/RJH0019



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 57 755.5

**Anmeldetag:** 22. November 2000

**Anmelder/Inhaber:** Bayer AG, Leverkusen/DE

**Bezeichnung:** Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen

**IPC:** C 12 N, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. September 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Ebert

**Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen**

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Phosphomevalonat Kinasen kodieren, die davon die kodierten Polypeptide sowie deren Verwendung als Targets für Herbizide und deren Verwendung zum Identifizieren von neuen, herbizid wirksamen Verbindungen sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.

Unerwünschtes Pflanzenwachstum kann durch die Verwendung von Herbiziden verhindert werden. Die Ansprüche an Herbizide sind dabei hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Kosten und Umweltverträglichkeit stetig angestiegen. Es existiert deshalb ein Bedarf an neuen Substanzen, die zu leistungsfähigen neuen Herbiziden entwickelt werden können. Im Allgemeinen ist es üblich, in Gewächshaustests nach solchen neuen Leitstrukturen zu suchen. Solche Tests sind jedoch arbeitsintensiv und teuer. Die Anzahl der Substanzen, die im Gewächshaus getestet werden können, ist entsprechend begrenzt.

Vorteilhafte Angriffspunkte für Herbizide werden in essentiellen Biosynthesewegen gesucht. So führt die Biosynthese von Isoprenoiden in Pflanzen u.a. zur Synthese von Carotinoiden sowie der Seitenketten des Plastochinons und des Chlorophylls. Diese Produkte sind für das photosynthetische Wachstum von Pflanzen unerlässlich. Die Inhibition eines Schrittes in diesem Biosyntheseweg führt zur Beendigung des Wachstums einer Pflanze. Des weiteren werden aus Isoprenoiden Pflanzenhormone wie Gibberelinsäure, Abscisinsäure und Brassinosteroide und Membrankomponenten (Phytosterole) gebildet, die auch für das Wachstums der Pflanze essentiell sind.

Isopentyldiphosphat (IPP) ist der Verzweigungspunkt von dem aus die verschiedensten Isoprenoide gebildet werden. Die Herstellung von IPP ist daher ein kritischer Punkt im Pflanzenstoffwechsel. In Pflanzen wird IPP über zwei verschiedene Stoffwechselwege in verschiedenen Kompartimenten hergestellt. Im

- Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Cytosol verläuft die Synthese von IPP über den klassischen Acetat/Mevalonat-Stoffwechselweg, wie er auch im tierischen Organismus abläuft. Dagegen wird in Chloroplasten IPP über den alternativen Glycerinaldehydphosphat/Pyruvat-Stoffwechselweg synthetisiert. Beide Stoffwechselwege sind essentiell, da verschiedene isoprenoide Metaboliten in den verschiedenen Kompartimenten gebildet werden. Ausserdem ist noch nicht geklärt inwieweit die beiden Stoffwechselwege autonom sind oder Metabolitenaustausch zwischen den Kompartimenten stattfindet (Heintze et al., 1990, Kleinig, 1989).
- Clomazone ist eine bekannte herbizide Verbindung, die den Gehalt an Carotinoiden und Chlorophyll im Blatt verringert. Es wurde lange Zeit angenommen, dass Clomazone über die Hemmung des Isoprenoid-Stoffwechselwegs wirkt. Norman et al. (1990) hatten gezeigt, dass der Wirkort zwischen Mevalonat und Geranylgeranyl Pyrophosphat liegen müsste. Das würde den Wirkort auf eines der dazwischen liegenden fünf Enzyme, von denen eines die Phophomevalonat Kinase ist, festlegen. Etwas neuere Arbeiten von Weimer et al. (1992) und Rodney Croteau (1992) weisen allerdings darauf hin, dass der Angriffspunkt von Clomazone an einer anderen Stelle zu suchen ist.
- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine cDNA aus *Arabidopsis thaliana* cv. columbia mit Homologie zur Phophomevalonat Kinase, im folgenden mit PMVK abgekürzt, aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (Abb. 1). Dieses Gen konnte in *Arabidopsis thaliana* cv. columbia durch Behandlung mit dem Herbizid Chlorsulfuron (10g/ha) induziert werden.
- Die Homologie zwischen der *Saccharomyces cerevisiae* PMVK (= ERG8) und der aus *A. thaliana* isolierten cDNA beträgt 44% Ähnlichkeit bzw. 35% Identität (siehe Abb. 1). Dies entspricht z.B. der Homologie zwischen der *Saccharomyces cerevisiae* Mevalonat Kinase und der *Arabidopsis thaliana* Mevalonat Kinase mit einer Ähnlichkeit von 45 % und einer Identität von 35 %. Für die Mevalonat Kinase aus *Arabidopsis thaliana* konnte die Funktion durch Komplementation der

entsprechenden Mutante aus *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Des weiteren weist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte cDNA eine 69 %ige Identität zu einer partiellen PMVK-Sequenz aus *Pinus radiata* gemäß SEQ ID NO:5 auf, die zur Modifikation von Isoprenoid-Gehalt, Isoprenoid-Zusammensetzung und Isoprenoid-Stoffwechsel von Pflanzen von Interesse ist (WO 00/36 081). Weitere partielle cDNAs aus Pflanzen (*Medicago trunculata*, Accession Number AA660847, siehe SEQ ID NO:3 und *Gossypium hirsutum*, Accession Number AI727861, siehe SEQ ID NO:4) sind als putative PMVKs isoliert worden. In Datenbanken sind aus verschiedenen Sequenzierungsprojekten verschiedene Sequenzen (ESTs und genomische Sequenz) aus *Arabidopsis* spp. zu finden, die der hier isolierten PMVK-Sequenz oder Teilen davon entsprechen, allerdings werden zu diesen Sequenzen oder Sequenzfragmenten keine Angaben zu Funktion oder Bedeutung gemacht.

Durch die vorliegende Erfindung wird nun zum ersten Mal die vollständige cDNA Sequenz einer pflanzlichen Phosphomevalonat Kinase zur Verfügung gestellt und deren Verwendung bzw. die Verwendung des davon kodierten Polypeptids zur Identifizierung neuer herbizider Wirkstoffe beschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb Nukleinsäuren, die für vollständige pflanzliche Phosphomevalonat Kinasen kodieren, mit Ausnahme der partiellen Nukleinsäuresequenzen aus *Medicago trunculata* gemäß SEQ ID NO:3, *Gossypium hirsutum* gemäß SEQ ID NO:4 und aus *Pinus radiata* gemäß SEQ ID ND:5.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Nukleinsäuren, die für die Phosphomevalonat Kinase aus *Arabidopsis thaliana* kodieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ganz besonders Nukleinsäuren, die für die Phosphomevalonat Kinase aus *Arabidopsis thaliana* kodieren und unter

SEQ ID NO:1 beschrieben sind und/oder für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO:2 oder aktive Fragmente davon kodieren.

5 Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.

10 Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um DNA-Fragmente, die der cDNA von Arabidopsispflanzen entsprechen.

Besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Sequenz ausgewählt aus

- 15 a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
- b) Sequenzen, die für ein Polypeptid codieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,
- 20 c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen,
- d) Sequenzen, welche an die unter a) oder b) definierten Sequenzen bei einer Hybridisierungstemperatur von 35-52°C hybridisieren,
- 25 e) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige, bevorzugt eine 85 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt eine 95 %ige Identität mit den unter a) definierten Sequenzen aufweisen,

30

f) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt eine 95 %ige Identität mit den unter b) definierten Sequenzen aufweisen,

5

g) Sequenzen, welche zu den unter a) oder b) definierten Sequenzen komplementär sind, und

10

h) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz codieren wie die unter a) bis f) definierten Sequenzen.

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 dar.

15

Der Ausdruck "vollständige" Phosphomevalonat Kinase wie er hierin verwendet wird, beschreibt die Phosphomevalonat-Kinase, die kodiert wird von einer vollständigen kodierenden Region einer Transkriptionseinheit beginnend mit dem ATG-Startcodon und umfassend alle informationstragenden Exonbereiche des im

20

Herkunftsorganismus vorliegenden, für die Phosphomevalonat-Kinase kodierenden Gens, sowie die für eine korrekte Termination der Transkription nötigen Signale.

20

Der Ausdruck "Gen", wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für einen Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, die für die Synthese einer Polypeptid-Kette verantwortlich ist.

25

Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der

30

hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Pflanzen als Arabidopsis isoliert werden, welche für Phosphomevalonat Kinasen

kodieren, welche dieselben oder ähnliche Eigenschaften wie die Kinase mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweisen.

5 Der Ausdruck "cDNA" wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige Kopie eines RNA-Moleküls und ist deshalb als Kopie biologisch aktiver mRNA intronfrei, d.h. alle kodierenden Regionen eines Gens sind in zusammenhängender Form enthalten.

10 Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

Die Schmelztemperatur  $T_m = 81.5\text{ °C} + 16.6 \log \{c(\text{Na}^+)\} + 0.41(\%G + C) - 500/n$  (Lottspeich und Zorbas, 1998).

15 Dabei ist  $c$  die Konzentration und  $n$  die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz  $>100$  bp entfällt der Ausdruck  $500/n$ . Mit höchster Stringenz wird bei einer Temperatur  $5\text{--}15\text{ °C}$  unterhalb  $T_m$  und einer Ionenstärke von  $15\text{ mM Na}^+$  (entspricht  $0.1 \times \text{SSC}$ ) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um  $10\text{--}15\text{ °C}$  höher.

20 Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: DIG Easy Hyb (Fa.: Roche)

25 Hybridisierungstemperatur:  $35\text{--}52\text{ °C}$ , bevorzugt  $42\text{ °C}$  (DNA-DNA) bzw.  $50\text{ °C}$  (DNA-RNA).

1. Waschschrift:  $2X\text{ SSC}$ , 2 mal 5 min bei Raumtemperatur;
2. Waschschrift: 2 mal 15min in  $1X\text{ SSC}$ , bei  $50\text{ °C}$ ; bevorzugt  $0,5X\text{ SSC}$ , bei  $65\text{ °C}$ ; besonders bevorzugt  $0,2X\text{ SSC}$ , bei  $65\text{ °C}$ .

30 Der Grad der Identität der Nukleinsäuren wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms NCBI BLASTN Version 2.0.4. (Altschul et al., 1997).



Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und einen homologen oder heterologen Promotor umfassen.

5

Der Ausdruck "homologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

10

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

15

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus für pflanzliche Zellen, der Promoter der Alkoholdehydrogenase für Hefezellen, die T3-, T7- oder SP6-Promotoren für prokaryotische Zellen oder zellfreie Systeme.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eine erfindungsgemäße regulatorische Region oder ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

25

30

Bevorzugte Vektoren sind pBIN (Bevan, 1984) und seine Derivate für pflanzliche Zellen, pFL61 (Minet et al., 1992) oder z.B. die p4XXprom. Vektorserie (Mumberg et al.) für Hefezellen, pSPORT-Vektoren (Fa. Life Technologies) für bakterielle Zellen, lamdaZAP (Fa. Stratagene) für Phagen oder den Gateway Vektoren (Fa. Life

Technologies) für verschiedene Expressionssysteme in bakteriellen Zellen oder Baculovirus.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

10 Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insekten, Pflanzen, Froschoozyten und Zelllinien von Säugern.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Phosphomevalonat Kinasen die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codiert werden.

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere  
20 bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie  
25 beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen,  
30 Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoy-

lierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

5 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

10 Die erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere das Polypeptid gemäß SEQ ID NO:2 müssen nicht vollständige pflanzliche Phosphomevalonat Kinasen darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen pflanzlichen Phosphomevalonat Kinase aufweisen. Polypeptide, die eine gleichartige biologische Aktivität wie eine  
15 Phosphomevalonat Kinase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 ausüben, werden noch als erfindungsgemäß betrachtet. Dabei müssen die erfindungsgemäßen Polypeptide nicht von Phosphomevalonat Kinasen aus Arabidopsis ableitbar sein. Als erfindungsgemäß werden auch Polypeptide betrachtet, die Phosphomevalonat Kinasen beispielsweise der folgenden Pflanzen  
20 entsprechen oder Fragmenten davon, die noch die biologische Aktivität dieser ausüben können: Tabak, Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Reis, Roggen, Tomaten, Leguminosen, Kartoffelpflanzen, *Lactuca sativa*, andere Brassicaceen, Holzgewächse, *Physcomitrella patens*.

25 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region von natürlich vorkommenden Phosphomevalonat Kinasen Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Kinase ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine  
30 Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
5. 4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Polypeptide, welche zumindest die biochemische Reaktion der Bildung von 5-Pyrophosphomevalonat aus 5-Phosphomevalonat wie die Phosphomevalonat Kinase ausüben und eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 60 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 97-99 %ige Identität, mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 über deren Gesamtlänge aufweist.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms BLASTP + BEAUTY Version 2.0 4. (Altschul et al., 1997).

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Phosphomevalonat Kinase (PMVK) mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

Die PMVK-Aminosäuresequenz besitzt im Bereich der Aminosäuren 177 bis 186 eine für Kinasen typische potentielle ATP- Bindungsstelle.

Der Ausdruck "biologische Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase", wie er hierin verwendet wird, bedeutet die Fähigkeit zur Umsetzung von 5-Phosphomevalonat zu 5-Pyrophosphomevalonat unter Verbrauch von ATP und der Entstehung von ADP.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch kurze Stücke der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können auch verwendet werden, um ausgehend von Pflanzen-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA-Fragmente ausgewählt. Nach

der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter  
5 Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet  
10 werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polypeptide mit Phosphomevalonat Kinase Aktivität, die von einer vorstehend genannten DNA kodiert werden.

15 Dem Fachmann ist bekannt, dass die Polypeptide der vorliegenden Erfindung auf verschiedenem Wege gewonnen werden können, z.B. durch chemische Methoden wie der Festphasenmethode. Zur Gewinnung größerer Proteinmengen empfiehlt sich die Verwendung rekombinanter Methoden. Die Expression eines klonierten Phosphomevalonat Kinase Gens oder Fragmente davon kann in einer Reihe von  
20 passenden Wirtszellen erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Zu diesem Zweck wird ein Phosphomevalonat Kinase Gen mit Hilfe bekannter Methoden in eine Wirtszelle eingeführt.

Die Integration des klonierten Phosphomevalonat Kinase Gens in das Chromosom  
25 der Wirtszelle liegt im Umfang der vorliegenden Erfindung. Vorzugsweise wird das Gen oder Fragmente davon in ein Plasmid gebracht, und die kodierenden Regionen des Phosphomevalonat Kinase Gens oder Fragmente davon mit einem konstitutiven oder induzierbaren Promotor funktionell verknüpft.

30 Die grundlegenden Schritte zur Herstellung der rekombinanten Phosphomevalonat Kinase sind:

1. Gewinnung einer natürlichen, synthetischen oder semi-synthetischen DNA, die für die Phosphomevalonat Kinase kodiert.
- 5 2. Einbringen dieser DNA in einen Expressionsvektor, der geeignet ist, die Phosphomevalonat Kinase zu exprimieren, entweder alleine oder als Fusionsprotein.
3. Transformation einer passenden, vorzugsweise prokaryontischen Wirtszelle mit diesem Expressionsvektor.
- 10 4. Anzucht dieser transformierten Wirtszelle in einer Weise, die geeignet ist, die Phosphomevalonat Kinase zu exprimieren.
- 15 5. Ernte der Zellen und Aufreinigung Phosphomevalonat Kinase durch geeignete, bekannte Methoden.

Die kodierenden Regionen der Phosphomevalonat Kinase kann dabei mit den üblichen Methoden in *E. coli* exprimiert werden. Geeignete Expressionssysteme für *E. coli* sind kommerziell erhältlich, so die Expressionsvektoren der pET-Serie, z.B. pET3a, pET23a, pET28a mit His-Tag oder pET32a mit His-Tag zur einfachen Aufreinigung und Thioedoxinfusion zur Erhöhung der Löslichkeit des exprimierten Enzyms, sowie pGEX mit Glutathionsynthetase-Fusion, sowie die pSPORT Vektoren. mit der Möglichkeit die kodierende Region unterschiedliche Vektoren des Gateway-Systems für verschiedene Expressionssysteme zu transferieren. Die Expressionsvektoren werden in  $\lambda$  DE3-lysogene *E. coli*-Stämme, z.B. BL21(DE3), HMS 174(DE3) oder AD494(DE3) transformiert. Nach dem Anwachsen der Zellen unter dem Fachmann geläufigen Standardbedingungen wird die Expression mit IPTG induziert. Nach Induktion der Zellen wird für 3 bis 24 Stunden bei Temperaturen von 18 bis 37°C inkubiert. Die Zellen werden durch Sonifikation in Aufschlusspuffer (10 bis 200 mM Natriumphosphat, 100 bis 500 mM NaCl, pH 5 bis 8 aufgeschlossen.

Das exprimierte Protein kann über chromatographische Methoden gereinigt werden, im Fall von mit His-Tag exprimiertem Protein durch Chromatographie an einer Ni-NTA-Säule.

- 5 Die Expression des Proteins in kommerziell erhältlichen Hefestämmen (z.B. *Pichia pastoris*) oder in Insektenzellkulturen (z.B. Sf9-Zellen) stellt einen anderen günstigen Ansatz dar.

Alternativ können die Proteine auch in Pflanzen exprimiert werden.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden und deren Eigenschaften verändern. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Terpenoide, die die Bildung ihres Vorläufers Isopentyl-Diphosphat und damit die Funktion der erfindungsgemäßen Phosphomevalonat Kinase notwendig machen, stellen Modulatoren, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen, neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe dar. Modulatoren können Agonisten oder Antagonisten bzw. Aktivatoren oder Inhibitoren sein.

15

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher insbesondere auch die Verwendung von pflanzlichen Phosphomevalonat Kinasen als Angriffspunkte für Herbizide und ihre Verwendung in Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieses Polypeptids. In solchen Verfahren können die Phosphomevalonat Kinasen direkt, in Extrakten oder aufgereinigt eingesetzt werden, oder mittelbar über die Expression der dafür kodierenden DNA entstehen.

25

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von für pflanzliche PMVK kodierender Nukleinsäuren, diese enthaltende DNA-Konstrukte, diese enthaltende Wirtszellen, oder von an PMVK bindenden Antikörpern zum Auffinden von Modulatoren der PMVK.



Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der Phosphomevalonat Kinase beschleunigt oder verstärkt.

5 Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der Phosphomevalonat Kinase verlangsamt oder verhindert.

10 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder  
15 strukturelle oder funktionelle Mimetika davon. Der Ausdruck "Modulator" umfasst jedoch nicht die natürlichen Substrate sowie ATP.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

20 Die Bindung der Modulatoren an die erfindungsgemäßen Phosphomevalonat Kinasen kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben der damit behandelten Pflanzen führt.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind damit auch Modulatoren, vorzugsweise Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von pflanzlichen Phosphomevalonat Kinasen, die mit Hilfe eines der nachfolgend beschriebenen Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren des Phosphomevalonat Kinase Proteins oder eines dazu homologen Polypeptids gefunden wurden.

30 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von Modulatoren der Phosphomevalonat Kinase als Herbizide.

Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, welche die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide verändern. Auch solche "Expressionsmodulatoren" können neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe darstellen. Expressionsmodulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die regulatorischen Regionen der für die erfindungsgemäßen Polypeptide codierenden Nukleinsäuren binden. Weiterhin können Expressionsmodulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an regulatorische Regionen der für die erfindungsgemäßen Polypeptide codierenden Nukleinsäuren bindet, und dadurch deren Expression beeinflusst. Expressionsmodulatoren können auch Antisense-Moleküle sein.

Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide oder von Expressionsmodulatoren als Pflanzenwuchsregulatoren oder Herbizide.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Expressionsmodulatoren von Phosphomevalonat Kinasen, die mit Hilfe eines vorstehend beschriebenen Verfahrens zum Identifizieren von Expressionsmodulatoren des Phosphomevalonat Kinase Proteins oder eines dazu homologen Polypeptids gefunden werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Expressionsmodulatoren als Herbizide.

Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening; HTS) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten.

Um Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro*-Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, wie ein Zellrohextrakt, oder irgendeine andere Präparation, die das erfindungsgemäße Polypeptid enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder

5 Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des

10 markierten Substrates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, aber nicht die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide auslösen, sind wahrscheinlich gute Antagonisten.

15 Die Detektion der biologischen Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide kann durch ein sog. Reportersystem verbessert werden. Reportersysteme in dieser Hinsicht umfassen, sind aber nicht beschränkt auf colorimetrisch markierte Substrate, die in ein Produkt umgewandelt werden oder ein Reportergen, das auf Veränderungen der Aktivität oder der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide anspricht oder

20 andere bekannte Bindungstests.

Modulatoren des erfindungsgemäßen Polypeptids können auch über enzymatische Tests aufgefunden werden. Es kann entweder die Änderung der Enzymaktivität durch entsprechende Modulatoren direkt oder in einem gekoppelten Enzymtest indirekt

25 gemessen werden. Die Messung kann z.B. über Absorptionsänderung durch die Ab- oder Zunahme einer optisch aktiven Verbindung durchgeführt werden.

Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und

30 einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder

Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Die erfindungsgemäßen Polypeptide selbst können markiert werden, z.B. radioaktiv oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann.

- 5 Auf diese Weise lässt sich die Effektivität eines Agonisten oder Antagonisten ermessen.

**Beispiel 1****Isolierung der für PMVK aus *A. thaliana* kodierenden Nukleinsäure**

5 Mit Hilfe der Methode der „Supression subtractive hybridization“ (Diatchenko et al., 1996) wurde mehrfach ein 370 bp Fragment der PMVK aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* cv. columbia Pflanzen isoliert.

10 Die „Supression subtractive hybridization“ stellt eine Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gene dar. Die zwei zu vergleichenden Proben waren zum einen Arabidopsispflanzen, die 24 Stunden nach Behandlung mit einem Herbizid (Chlorsulfuron, 10g/ha) geerntet wurden, und zum anderen Arabidopsispflanzen, die 24 Stunden nach einer Kontrollbehandlung geerntet wurden. Das 370 bp PMVK-Fragment wurde aus den mit Chlorsulfuron behandelten Pflanzen isoliert, in denen  
15 die Transkription der PMVK durch die Behandlung möglicherweise induziert worden war.

Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pTAdv (Clontech) kloniert und in den *E. coli* Stamm TOP10F' transformiert. Das Fragment der PMVK wurde weiterhin als  
20 Sonde für virtual Northern (Clontech) Blots verwendet und zur Isolierung der vollständigen cDNA von PMVK als Sonde eingesetzt.

**Isolierung der vollständigen cDNA Sequenz von *PMVK***

25 Es wurde eine Arabidopsis cDNA-Bibliothek der Firma Life Technologies im Plasmid-Vektor pSPORT mit Hilfe des Cloncapture Kits von Clontech nach Angaben des Herstellers gescreent. Im Unterschied zu den Angaben des Herstellers wurde jedoch die Markierung des als Sonde eingesetzten PMVK Fragments mit Biotin nicht mittels PCR sondern mit Hilfe des Biotin High Prime Kit der Firma  
30 Boehringer durchgeführt.

Die mit PMVK angereicherte Plasmid-DNA wurde in *E. coli* Zellen transformiert und über Nacht ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien wurden durch Kolonie-PCR mit PMVK-genspezifischen Primern analysiert und positive Kolonien identifiziert.

- 5 Von den positiven Kolonien wurden mit dem Fachmann bekannten Methoden Kulturen angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und die DNA anschließend sequenziert.

### Beispiel 2

10

Zur Überprüfung einer differentiellen Expression der PMVK in Reaktion auf Chlorsulfuron wurden so genannte virtual Northern Blot Analysen durchgeführt.

15

Bei einem virtual Northern Blot wird mit der SMART Methode der Firma Clontech (siehe Angaben des Herstellers) aus Gesamt-RNA cDNA hergestellt und mit PCR amplifiziert. Es werden nur so wenige PCR Zyklen eingesetzt, dass die Amplifikation sich noch im linearen Bereich der PCR befindet. In vorliegenden Fall zeigte sich ein Optimum zwischen 15 und 18 Zyklen. Die SMART cDNA wird nach dem Fachmann bekannten Methoden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine  
20 Nylonmembran übertragen und mit einer mit DIG markierten Sonde hybridisiert. Diese Methode erlaubt die Untersuchung der Expression auch von nur gering exprimierten Genen.

25

Das Ergebniss zeigte eine leichte Induktion der PMVK-Expression durch Chlorsulfuron.

**Beispiel 3**

Ein Testsystem zur Identifizierung von Modulatoren der Phosphomevalonatkinase beruht auf dem ADP-Nachweis des gekoppelten Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-Tests.

Phosphoenolpyruvat wird durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt, dieses wird dann anschliessend von der Lactatdehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Lactat umgesetzt. Der NADH-Verbrauch lässt sich durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgen.

Bei der Reaktion der PMVK wird ADP gebildet, welches dann über den beschriebenen Test nachgewiesen werden kann. Der Einfluss von Modulatoren der PMVK auf diese Reaktion kann damit anhand einer Erhöhung oder Erniedrigung des ADP Gehalts bestimmt werden.

**Abbildungen und Sequenzprotokoll****Abbildung 1**

Bestimmung der Homologie zwischen der erfindungsgemäßen Phosphomevalonat Kinase aus *A. thaliana* gemäß SEQ ID NO:2 und der bekannten Phosphomevalonat Kinase aus *S. cerevisiae* (BESTFIT). Die Ähnlichkeit beträgt 44 %, die Identität 35 %.

**SEQ ID NO:1**

Nukleinsäuresequenz kodierend für Phosphomevalonat Kinase aus *A. thaliana*.

SEQ ID NO:2

Aminosäuresequenz der Phosphomevalonat Kinase aus *A. thaliana*.

5      SEQ ID NO:3

Nukleinsäurefragment aus *Medicago trunculata* (putative PMVK) der Accession Numbo AA 660847.

10     SEQ ID NO:4

Nukleinsäurefragment aus *Gossypium hirsutum* (putative PMVK) der Accession Number AI 727861.

15     SEQ ID NO:5

Nukleinsäurefragment aus *Pinus radiata* (kodierend für PMVK gemäß WO 00/36081).



**Literatur**

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.Z.; Miller W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST und PSI-BLAST generation of protein database search  
5 programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Bevan, M. 1984. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic  
Acids Res 12(22): 8711-8721.

10 Croteau, R., 1992. Clomazone Does Not Inhibit the Conversion of Isopentyl  
Pyrophosphate to Geranyl, Farnesyl, or Geranylgeranyl Pyrophosphate *in Vitro*. Plant  
Physiol. 98, 1515-1517

15 Diatchenko, L., Lau, Y. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B.,  
Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. 1996.  
Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially  
regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
93, 6025-6030

20 Heintze, A., Görlach, J., Schulze-Siebert, D. Schultz, G. 1990. Plastidic isoprenoid  
synthesis during chloroplast development. Change from metabolic autonomy to  
division-of-labor stage. Plant Physiol. 93, 1121-1127

25 Lottspeich, F., Zorbas H. (Hrsg.). 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer  
Verlag, Heidelberg, Berlin.

Minet, M., Dufour, M.-E. and Lacroute, F. 1992. Complementation of  
*Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs.  
Plant J. 2: 417-422.

30

Mumberg, D., Müller, R., Funk, M., 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.

- 5 Norman, M. A., Liebl, R. A., Widholm, J. M., 1990. Site of Clomazone Action in Tolerant-Soybeyn and Susceptible-Cotton Photomixotrophic Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 94, 704-709

- 10 Weimar, M. R., Balke, N. E., Buhler, D. D., 1992. Herbicide Clomazone Does Not Inhibit *In Vitro* Geranylgeranyl Synthesis from Mevalonate. *Plant Physiol.* 98, 427-432

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäuren, kodierend für pflanzliche Phosphomevalonat Kinasen, wobei die Nukleinsäurefragmente gemäß SEQ ID NO: 3, 4 und 5 ausgenommen sind.  
5
2. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie für Phosphomevalonat Kinasen aus *A. thaliana* kodieren.
- 10 3. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.
4. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder cDNA handelt.  
15
5. Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus *A. thaliana* stammen.
- 20 6. Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend eine Sequenz ausgewählt aus
  - (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
  - (b) Sequenzen, die für ein Polypeptid codieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,  
25
  - (c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) oder (b) definierten Sequenzen,
  - 30 (d) Sequenzen, welche an die unter (a) oder (b) definierten Sequenzen bei einer Hybridisierungstemperatur von 35-52°C hybridisieren,

- (e) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige Identität zu den unter (a) oder (b) definierten Sequenzen aufweisen,
- 5 (f) Sequenzen, welche zu den unter a) oder b) definierten Sequenzen komplementär sind, und
- (g) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter a) bis
- 10 e) definierten Sequenzen.
7. DNA-Konstrukt umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und einen heterologen Promotor.
- 15 8. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 7.
9. Vektor gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
- 20 10. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 7 oder einen Vektor gemäß Anspruch 8 oder 9.
- 25 11. Wirtszelle gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische Zelle handelt.
12. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine
- 30 eukaryotische Zelle handelt.

13. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase, welches von einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert wird.
- 5 14. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase, welches eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine zumindest 70 %ige Identität mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweist.
- 10 15. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 oder 14 bindet.
16. Verfahren zum Herstellen einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend die folgenden Schritte:
- 15 (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder
- (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer genomischen oder cDNA-Bank, die ausgehend von genomischer DNA bzw. mRNA aus Pflanzenzellen hergestellt wurde, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder
- 20
- (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
- 25
17. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 13, umfassend

- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 gewährleisten, oder
- 5 (b) das Exprimieren einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in einem *in vitro*-System, und
- (b) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem *in vitro*-System.
- 10 18. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 oder 14 bindet und/oder die Aktivität dieses Polypeptids moduliert, umfassend die folgenden Schritte:
- 15 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 13 oder 14 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und
- 20 (b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.
- 25 19. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, welche die Expression von Polypeptiden gemäß Anspruch 13 verändert, umfassend die folgenden Schritte:
- 30 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,

- (b) Bestimmen der Polypeptidkonzentration, und
- (c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.

5

20. Verwendung von Phosphomoevalonat Kinasen aus Pflanzen, von dafür kodierenden Nukleinsäuren, DNA-Konstrukten oder Wirtszellen enthaltend diese Nukleinsäuren zum Auffinden von neuen herbiziden Wirkstoffen.

10

21. Verwendung eines Modulators eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase als Pflanzenwuchsregulator oder Herbizid.

15

22. Modulatoren, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 19 identifiziert werden.

23. Herbizid wirksame Substanzen, die mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 18 oder 19 gefunden werden.

**Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen**

**Z u s a m m e n f a s s u n g**

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Phosphomevalonat Kinasen kodieren, die davon die kodierten Polypeptide sowie deren Verwendung als Targets für Herbizide und deren Verwendung zum Identifizieren von neuen, herbizid wirksamen Verbindungen sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.



A. t. 6 SAPGKVLMTGGYLVLEKPNAGLVLSTNARFYAIVKPINEEVKPESWAWKW 55  
 ||||| | : ||||| : | . . | : | : | . .  
 S. c. 8 SAPGKALLAGGYLVLDTKYEAFFVVGLSARMHAVAHPYGSLOQSDKF.... 53  
 . . . . .  
 56 TDVKLTSPQL.SRESMYKLSLNHLTLQSVSASDSRNPFVEHAIQYAIAAA 104  
 :|: . | | | : | : | : | | | : | | | .  
 54 .EVRVKSKQFKDGEWLYHISPKSGFI.PVSIGGSKNPFIEKVI..ANVFS 99  
 . . . . .  
 105 HLATEKDKESSLHKLLLQGLDITILGSNDFYSYRNQIESAGLPLTPESLGT 154  
 : | | | | . : || | . | . | : | | |  
 100 YFKPNMDDYCNRNLFV..IDIF...SDD..AYHSQEDS.....VTEHRG. 136  
 . . . . .  
 155 LAPFASITFNAAESNGANSKPEVAKTGLGSSAAMTTAVVAALLHYLGVD 204  
 | | | . . | | | | | | : | . | | |  
 137 .....NRRLSFHSHRIEEVPKTGLGSSAGLVTVLTTALASFF.VSD 176  
 . . . . .  
 205 LSDPCKEGKFGCSDLDVIHMIAQTSHCLAQKGKVGSGFDVSCAVYGSQRYV 254  
 | . . : : || : || . || | | | : | | | |  
 177 LENNVDKYR.....EVIHNLAQVAHCQAQKIGSGFDVAAARYGSIRYR 220  
 . . . . .  
 255 RFSPEVL SFAQVAVTGLPLNEVIGTILKGKWDNKRTEFSLPPLMNLFLGE 304  
 || | . : | . . . : . | . | | : | : | :  
 221 RFPPALISNLPDIGSATYGSKLHLVDEEDWNITIKSNHLP SGLTLWMGD 270  
 . . . . .  
 305 PGSGGSSTPSMVGAVKKWQMSDPEKARENWQNLSDANLELET KLNDLSKL 354  
 || | : | || | | . . : | || | . | : |  
 271 I.KNGSETVKLVQKVKNWYDSHPESLKIYTELDHANSR FMDGLSKLDRL 319  
 . . . . .  
 355 AKDHW DVYL RVIKSC..SVLTSEKWVLHATEPINEAIIKELLEAREAML R 402  
 . | | . : . | . | : | : | : | | : | .  
 320 HETHDDYSDQIFESLERNDCTCQKY.....PEITEVRDAVAT 356  
 . . . . .  
 403 IRILMRQMGEAASVPIEPESQTQLLDSTMSAEGVLLAGVPGAGGFDAIFA 452  
 || | . . . || | || | . . || | : || | | : ||  
 357 IRRSFRKITKESGADIEPPVQTSLLDDCQTLKGVL TCLIPGAGGYDAIAV 406  
 . . . . .  
 453 ITLGD 457  
 || | |  
 407 ITKQD 411

Abbildung 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer AG

<120> Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen

<130> Le A 35 018

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2396

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (685) .. (2199)

<400> 1

```

gtcgcacccac gcgtccgggc cgaccttctt cttcttcctt aagacaacac ataatgatag 60
aagcaaactg gggaagatga agatggagtg gtgaagaaca aaaccgtata accgttcggt 120
tcagaggtgc cgaaccgaac cgaccgtaa accgaaatcc tcaaaagaaa ttgccgatcg 180
gtttgctact gttcaaaacc tcggtgccga gaaccgaaac tgcgggtttt ttcggttcgg 240
gtttctcggt ttcttccgaa ctcccaggcc tagtttggtt ttatttttca cgagttttgc 300
ttctcttttc atcggcgacg acgacgtcga gtttctgtca aaacgttaac gatccgactc 360
gagcgtcgac agtaagagaa gaagacagcg attgtgtgta gatcgacggc gaacgtgtgt 420
cgatccgtct cgatcgacgg agaatacgtt tcgatccggt ttcgatcaa atcgagagat 480
ttgaggatct aaatcgaaa ttgcattaat actcatctcc aatctcttct gaagagtccg 540
aatccgatct accaccacta ctcgtaaccgc cggtcattta ctgccgccga tttcaaatta 600
tccgatcatt tccggcgata tccaatcgca gactgaggtg aatctggggg tttgatcagc 660
gattatcttt gtcactcttt gaaa atg gct gtt gtt gct tct gct cct ggg      711
                        Met Ala Val Val Ala Ser Ala Pro Gly
                          1                      5

aaa gtt ttg atg act gga ggc tac ctt gta ctc gag aag cca aat gca      759
Lys Val Leu Met Thr Gly Gly Tyr Leu Val Leu Glu Lys Pro Asn Ala
  10                      15                      20                      25

ggg ctt gtg ttg agt aca aat gca cgg ttt tac gcg att gtg aag cca      807
Gly Leu Val Leu Ser Thr Asn Ala Arg Phe Tyr Ala Ile Val Lys Pro
                      30                      35                      40

atc aac gaa gaa gtc aag cct gaa agt tgg gca tgg aaa tgg aca gat      855
Ile Asn Glu Glu Val Lys Pro Glu Ser Trp Ala Trp Lys Trp Thr Asp
                      45                      50                      55

```

gtc	aaa	tta	aca	tca	cca	cag	ctc	tcg	aga	gaa	agc	atg	tat	aaa	ctg	903
Val	Lys	Leu	Thr	Ser	Pro	Gln	Leu	Ser	Arg	Glu	Ser	Met	Tyr	Lys	Leu	
		60					65					70				
tca	ctg	aat	cat	ttg	act	ctt	cag	tct	gtg	tct	gca	agt	gat	tca	aga	951
Ser	Leu	Asn	His	Leu	Thr	Leu	Gln	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Arg	
	75					80					85					
aac	ccc	ttt	gta	gag	cat	gcg	ata	cag	tat	gct	ata	gct	gct	gct	cat	999
Asn	Pro	Phe	Val	Glu	His	Ala	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	His	
90					95					100					105	
ttg	gca	acc	gag	aag	gac	aaa	gaa	tca	ttg	cac	aaa	ctc	tta	ttg	caa	1047
Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Asp	Lys	Glu	Ser	Leu	His	Lys	Leu	Leu	Leu	Gln	
			110						115					120		
ggt	ctt	gat	ata	aca	ata	tta	ggc	tcc	aat	gac	ttt	tac	tca	tat	cgg	1095
Gly	Leu	Asp	Ile	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	Asn	Asp	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Arg	
			125					130					135			
aac	cag	ata	gaa	tcg	gct	ggg	ctt	cca	ttg	aca	cca	gaa	tcg	ctg	ggt	1143
Asn	Gln	Ile	Glu	Ser	Ala	Gly	Leu	Pro	Leu	Thr	Pro	Glu	Ser	Leu	Gly	
		140					145					150				
acc	ctt	gca	ccg	ttt	gca	tca	atc	aca	ttc	aat	gct	gcg	gag	tca	aat	1191
Thr	Leu	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	Ile	Thr	Phe	Asn	Ala	Ala	Glu	Ser	Asn	
	155					160					165					
ggt	gct	aat	tcc	aag	cct	gaa	gta	gca	aaa	act	ggc	tta	ggt	tct	tct	1239
Gly	Ala	Asn	Ser	Lys	Pro	Glu	Val	Ala	Lys	Thr	Gly	Leu	Gly	Ser	Ser	
170					175					180					185	
gca	gca	atg	aca	aca	gct	gtg	gtt	gca	gct	ctg	tta	cat	tat	ctt	gga	1287
Ala	Ala	Met	Thr	Thr	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Tyr	Leu	Gly	
				190					195					200		
gtg	gtt	gac	cta	tct	gat	cca	tgt	aaa	gaa	gga	aag	ttt	ggc	tgt	tct	1335
Val	Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Cys	Lys	Glu	Gly	Lys	Phe	Gly	Cys	Ser	
			205					210					215			
gat	cta	gat	gtt	atc	cat	atg	ata	gca	caa	acg	tct	cat	tgt	ctt	gca	1383
Asp	Leu	Asp	Val	Ile	His	Met	Ile	Ala	Gln	Thr	Ser	His	Cys	Leu	Ala	
		220					225					230				
caa	ggg	aag	gtc	gga	agt	ggg	ttt	gat	gtc	agc	tgt	gct	gtc	tat	gga	1431
Gln	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Gly	Phe	Asp	Val	Ser	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	
	235					240					245					
agt	cag	cgt	tat	gtt	cgc	ttc	tct	cca	gaa	gtc	ttg	tca	ttt	gct	cag	1479
Ser	Gln	Arg	Tyr	Val	Arg	Phe	Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Phe	Ala	Gln	
250					255					260					265	
gtt	gca	gta	aca	ggg	ctg	cca	tta	aat	gaa	gtt	att	ggg	aca	att	ttg	1527
Val	Ala	Val	Thr	Gly	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Val	Ile	Gly	Thr	Ile	Leu	
			270						275					280		
aag	gga	aaa	tgg	gac	aat	aag	aga	act	gag	ttc	tct	tta	cca	cca	ctg	1575
Lys	Gly	Lys	Trp	Asp	Asn	Lys	Arg	Thr	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Pro	Leu	
			285					290					295			
atg	aat	ctt	ttc	ctt	gga	gaa	cct	gga	agt	ggg	gga	tcc	tcc	aca	cca	1623
Met	Asn	Leu	Phe	Leu	Gly	Glu	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Pro	
		300					305					310				

tca atg gta ggt gca gta aag aag tgg caa atg tct gat cca gag aag	1671
Ser Met Val Gly Ala Val Lys Lys Trp Gln Met Ser Asp Pro Glu Lys	
315 320 325	
gca cga gaa aac tgg cag aat ttg tca gat gca aat tta gaa ctg gaa	1719
Ala Arg Glu Asn Trp Gln Asn Leu Ser Asp Ala Asn Leu Glu Leu Glu	
330 335 340 345	
act aag cta aac gat ctg agc aaa tta gct aaa gac cac tgg gat gtt	1767
Thr Lys Leu Asn Asp Leu Ser Lys Leu Ala Lys Asp His Trp Asp Val	
350 355 360	
tat cta cga gtc att aag tct tgt agt gtg ctt act tct gaa aag tgg	1815
Tyr Leu Arg Val Ile Lys Ser Cys Ser Val Leu Thr Ser Glu Lys Trp	
365 370 375	
gtg tta cat gct act gaa cca atc aac gaa gcc att att aaa gaa ctc	1863
Val Leu His Ala Thr Glu Pro Ile Asn Glu Ala Ile Ile Lys Glu Leu	
380 385 390	
tta gag gca aga gaa gct atg ttg agg atc aga att ctt atg cgt cag	1911
Leu Glu Ala Arg Glu Ala Met Leu Arg Ile Arg Ile Leu Met Arg Gln	
395 400 405	
atg ggt gag gcg gct agc gtt ccg ata gag cct gaa tct caa act caa	1959
Met Gly Glu Ala Ala Ser Val Pro Ile Glu Pro Glu Ser Gln Thr Gln	
410 415 420 425	
ctt ttg gat tct aca atg agt gct gaa gga gtt cta ctt gct ggt gtt	2007
Leu Leu Asp Ser Thr Met Ser Ala Glu Gly Val Leu Leu Ala Gly Val	
430 435 440	
cct gga gct ggt gga ttt gat gcc ata ttt gca atc act tta ggg gat	2055
Pro Gly Ala Gly Gly Phe Asp Ala Ile Phe Ala Ile Thr Leu Gly Asp	
445 450 455	
tcc ggc acc aaa ctg acc cag gca tgg agt tcg cac aat gtt ttg gcc	2103
Ser Gly Thr Lys Leu Thr Gln Ala Trp Ser Ser His Asn Val Leu Ala	
460 465 470	
ttg ttg gtg aga gaa gat cca cat ggc gtt tgc cta gaa agt ggt gat	2151
Leu Leu Val Arg Glu Asp Pro His Gly Val Cys Leu Glu Ser Gly Asp	
475 480 485	
cca cga acc aca tgt att act tca ggc gtt tca tca att cac ctt gag	2199
Pro Arg Thr Thr Cys Ile Thr Ser Gly Val Ser Ser Ile His Leu Glu	
490 495 500 505	
taaacaacat tgtttcagtg tccaattatt aggtgcgtca ccaagttcgg ttgagtatac	2259
tgttttgcat atagacttgg gtgctaaatt tcttggtgta agcattttta taccattgt	2319
aaggtcttta actcttgga aacttgcggg aaaataaaat aaagttgatt tcaaattcttc	2379
tcaaaaaaaaa aaaaaaa	2396

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 505

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 2

Met	Ala	Val	Val	Ala	Ser	Ala	Pro	Gly	Lys	Val	Leu	Met	Thr	Gly	Gly	1	5	10	15
Tyr	Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Ser	Thr	Asn	20	25	30	
Ala	Arg	Phe	Tyr	Ala	Ile	Val	Lys	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	35	40	45	
Glu	Ser	Trp	Ala	Trp	Lys	Trp	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Thr	Ser	Pro	Gln	50	55	60	
Leu	Ser	Arg	Glu	Ser	Met	Tyr	Lys	Leu	Ser	Leu	Asn	His	Leu	Thr	Leu	65	70	75	80
Gln	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Glu	His	Ala	85	90	95	
Ile	Gln	Tyr	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	His	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Asp	Lys	100	105	110	
Glu	Ser	Leu	His	Lys	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Leu	Asp	Ile	Thr	Ile	Leu	115	120	125	
Gly	Ser	Asn	Asp	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Asn	Gln	Ile	Glu	Ser	Ala	Gly	130	135	140	
Leu	Pro	Leu	Thr	Pro	Glu	Ser	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	145	150	155	160
Ile	Thr	Phe	Asn	Ala	Ala	Glu	Ser	Asn	Gly	Ala	Asn	Ser	Lys	Pro	Glu	165	170	175	
Val	Ala	Lys	Thr	Gly	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Met	Thr	Thr	Ala	Val	180	185	190	
Val	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Tyr	Leu	Gly	Val	Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	195	200	205	
Cys	Lys	Glu	Gly	Lys	Phe	Gly	Cys	Ser	Asp	Leu	Asp	Val	Ile	His	Met	210	215	220	
Ile	Ala	Gln	Thr	Ser	His	Cys	Leu	Ala	Gln	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Gly	225	230	235	240
Phe	Asp	Val	Ser	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Ser	Gln	Arg	Tyr	Val	Arg	Phe	245	250	255	
Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Phe	Ala	Gln	Val	Ala	Val	Thr	Gly	Leu	Pro	260	265	270	
Leu	Asn	Glu	Val	Ile	Gly	Thr	Ile	Leu	Lys	Gly	Lys	Trp	Asp	Asn	Lys	275	280	285	
Arg	Thr	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Pro	Leu	Met	Asn	Leu	Phe	Leu	Gly	Glu	290	295	300	
Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Met	Val	Gly	Ala	Val	Lys	305	310	315	320
Lys	Trp	Gln	Met	Ser	Asp	Pro	Glu	Lys	Ala	Arg	Glu	Asn	Trp	Gln	Asn	325	330	335	

Leu Ser Asp Ala Asn Leu Glu Leu Glu Thr Lys Leu Asn Asp Leu Ser  
 340 345 350  
 Lys Leu Ala Lys Asp His Trp Asp Val Tyr Leu Arg Val Ile Lys Ser  
 355 360 365  
 Cys Ser Val Leu Thr Ser Glu Lys Trp Val Leu His Ala Thr Glu Pro  
 370 375 380  
 Ile Asn Glu Ala Ile Ile Lys Glu Leu Leu Glu Ala Arg Glu Ala Met  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ile Arg Ile Leu Met Arg Gln Met Gly Glu Ala Ala Ser Val  
 405 410 415  
 Pro Ile Glu Pro Glu Ser Gln Thr Gln Leu Leu Asp Ser Thr Met Ser  
 420 425 430  
 Ala Glu Gly Val Leu Leu Ala Gly Val Pro Gly Ala Gly Gly Phe Asp  
 435 440 445  
 Ala Ile Phe Ala Ile Thr Leu Gly Asp Ser Gly Thr Lys Leu Thr Gln  
 450 455 460  
 Ala Trp Ser Ser His Asn Val Leu Ala Leu Leu Val Arg Glu Asp Pro  
 465 470 475 480  
 His Gly Val Cys Leu Glu Ser Gly Asp Pro Arg Thr Thr Cys Ile Thr  
 485 490 495  
 Ser Gly Val Ser Ser Ile His Leu Glu  
 500 505

<210> 3  
 <211> 611  
 <212> DNA  
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 3  
 ctgttatctg agttgaagaa atatcacaat atcaatggcc gtggtggttg cttctgctcc 60  
 tgggaagggtg ttaatgaccg gtggctacct agtttttagag agacctaatg ctggacttgt 120  
 tcttagtact aatgctcggt tttatgctat tgtcaaacca atctatcctc aaactaaacc 180  
 tgattcttgg gcttgggctt ggtcagatgt cagattaaca tctcctcaac tctccagaga 240  
 agccttctat aaattagcac tcaaaaatct taccatccaa actgtttcct caagtgaac 300  
 aaggaaccct tttgtggaat atgctgtgca atactccgtg gctgccgcct atgcaacagc 360  
 tgaccagaat aaaaaggact tgttgcacaa actacttttg caaggtcttg acattacaat 420  
 tttgggttcc aatgattttt attcttatag gaatgagatt gagagacacg gactcccttt 480  
 gacatcagaa tcattggcca cccttccgcc ttttgctcctc atttctttca atactgatga 540  
 tgctaattga aggaattgta agcctgaaat tgccaaaact ggtttgggct catctgcagc 600  
 aatgacaacc g 611

<210> 4  
 <211> 728  
 <212> DNA  
 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 4  
 cgtttttacg ctattgttaa gccaatcat gaagctatca agcctgaaag ctgggcatgg 60  
 tcttgaccg atgtcaagct aacatctcct cagctttcca gagaaagcat gtataaattg 120

tctcggaaac	atttaacact	tcagtgtgta	tcttcaagtg	aatcaaggaa	cccttttgta	180
gaaaatgcta	ttcaatatac	tatagcagct	gcacatgcaa	catttgacaa	gaataagaaa	240
gaggcattag	ataaactact	cttacaaggt	cttgatatta	cgatcttagg	ttgcaatgac	300
ttttactcat	acaggaatca	gatagaagca	cttggctctc	cgttgacacc	tgaagcattg	360
gctactctac	caccgtttac	atcaattaca	ttcaattctg	aggaatcaaa	tggagcaaat	420
tgcaaacctg	aagttgcaaa	aactggattg	ggttcatctg	cagcaatgac	aactgctgta	480
gttgctgctt	tacttcatta	tcttgggtgt	gttaaccttt	ccacctcttc	tgcagatcaa	540
caccaagaaa	ataagaattc	cacagatctc	gatattgtgc	atatgatagc	tcaaagtgcc	600
cactgtattg	cccaaggtaa	agttggcagt	ggctttgatg	tcagttctgc	tgtctatggg	660
agtcagcgtt	atgttcgttt	ttcaccaaaa	gtgctttctg	ctgctcaggc	tgcantgaaa	720
gggatgcc						728

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 571

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pinus radiata

&lt;400&gt; 5

cacaggcgaa	accctctcct	gctgctcacg	gttgataaac	cctcaatatt	tgcggtaggg	60
ctccagatth	actgcaatct	gccagtaaga	gtccgttgtg	gcggaagaga	gctgccgaga	120
gctgccgagc	tgagagcac	cattcgcacc	atatagagaa	gggggttgat	agattcctgg	180
tcaaggaaaa	ctgacaataa	ggtgaaaaaa	acaataatta	ccttcagatt	atctgatcat	240
cacatggctg	tagttgtgtc	agctcctggg	aaggttttta	taacaggagc	ttatctaatt	300
cttgagaagc	caaatccagg	acttgtgctt	accaccacag	ctcgcttcta	cgccattgtg	360
aagccactgc	ggactagcac	agattccagt	agttgggcat	ggctatggac	agatgtgaaa	420
ttaacatcgc	ctcagcttgc	aaaggaggcc	atctacaagc	tatctctgaa	gactccttagc	480
ctgcaaaaatg	ttgcttcttc	aagtagcaat	ggtaatcctt	ttgtggaaca	agcagtgcaa	540
tttgctgttg	cagctgcaaa	agaagccttt	g			571